PRÉSENCE D'ENZYMES, D'ACIDES AMINÉS LIBRES ET PROTÉIQUES DANS LE MILIEU DE CULTURE DE L'USTILAGO VIOLACEA (PERS.) ROUSS.

par M. BATCHO* et C. CARDON**

RÉSUMÉ. — Nous avons déterminé la nature de certains produits d'excrétion de l'*Ustilago violacea*. Quatre enzymes : la phosphatase acide, la phosphatase basique, la phosphoamidase et l'esterase lipase ont été mis en évidence dans le filtrat de culture. La concentration des protéines totales excrétées dans le filtrat évolue en fonction de la croissance de la souche. Les acides aminés libres et protéiques ont été identifiés.

SUMMARY. – We have determined nature of some excretion produces of *Ustilago violacea*. Four enzymes, acid phosphatase, alkaline phosphatase, phosphoamidase and esterase lipase were found in culture filtrates. Excreted proteins rate vary with the fungus growth; free amino acids and protein bound amino acids are identified.

Parmi les troubles métaboliques provoqués par le parasitisme, certains auteurs ont signalé des modifications quantitatives et qualitatives au niveau des acides aminés (HRUSHOVETZ, 1954, SHAW et COLOTELO, 1961; BARBARA et BOONE, 1963, VAN ANDEL, 1966, ARJUNAN et coll., 1966, CLITON et PHILIP, 1977).

Dans un travail précédent, (LEGRAND et coll., 1977), nous avons montré que l'*Ustilago violacea*, parasite de *Silene dioica*, modifie les acides aminés et les peroxydases de l'hôte. De même, en cultivant sur un même milieu l'*Ustilago violacea* et les tissus isolés de *Silene alba*, sans contact apparent entre les deux

* Laboratoire de physiologie végétale, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex.

** Laboratoire de Biochimie, Université des Sciences et Techniques de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex

organismes, nous avons constaté que la prolifération des tissus était inhibée (BATCHO et DUBOIS, 1974).

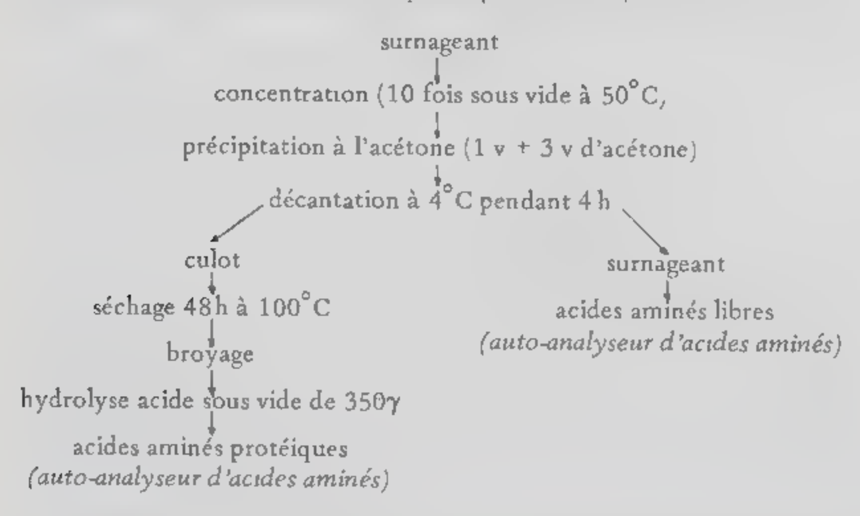
De plus certains champignons parasites cultivés en dehors de leur hôte, libèrent dans le milieu différents composés, en particulier des acides aminés (REDDY et RAO, 1975; VIJAYA KUMAR et RAO, 1976 et 1977) et des enzymes (HANSSLER et coll., 1977).

Il nous a donc semblé intéressant de détecter dans le milieu de culture d'*Ustilago violacea* les acides aminés libres et protéiques et certains enzymes libérés au cours de la croissance du champignon.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Trois souches d'*Ustilago violacea* ont été étudiées deux clônes compatibles isolés au laboratoire (B 874 et B 974) et une souche provenant de la mycothèque de Baarn (438 34). 0,1 ml d'une culture de 15 jours de chaque souche est repiqué dans une fiole de 500 ml contenant 200 ml de milieu de Lescure auquel on ajoute 10^{-6} g l^{-1} de vitamine B_1. Les cultures sont placées dans une pièce obscure à 21°C ± 1 sur une table d'agitation qui assure l'aération.

Tous les cinq jours, trois fioles de chaque souche sont prélevées, centrifugées à 3500 tours minute pendant 30 minutes à 15°C, le culot sert à la mesure du poids frais du champignon, le poids sec est déterminé après un séchage de 48 h au four à 100°C. Une partie du surnageant sert à doser les protéines totales par la méthode de LOWRY et coll. (1951), une partie à rechercher différentes activités enzymatiques par la méthode API ZYM et une troisième partie à déterminer les acides aminés libres et protéiques selon le protocole suivant



Les résultats sont exprimés en nanomoles d'acides aminés pour une prise d'essai de 0,1 ml. Toutes les expériences sont renouvelées trois fois.

RÉSULTATS

1 - Évolution des protéines excrétées au cours de la croissance

Pour les trois souches d'*Ustilago violacea*, la croissance est active les 10 premiers jours de culture (fig. 1). L'optimum pondéral se situe entre le 15e et le 20e jour, celui de la souche de Baarn (438.34) étant le plus élevé.

A ce stade, la souche de Baarn est constituée de filaments isolés dont les cellules mycéliennes sont apparemment dépourvues de globules lipidiques. Les souches B 874 et B 974 de forme levuroïde sont rarement bourgeonnantes et renferment chacune une énorme vacuole.

A partir du 15e jour, la diminution du poids sec des trois souches indique le début de lyse des cellules (fig. 1).

Parallèlement, la libération des protéines dans le milieu est d'abord lente du 1er au 5e jour (fig. 2), puis s'accélère activement entre le 5e et le 10e jour pendant la phase active de croissance; elle s'arrête plus tôt pour les souches B 874 et B 974 que pour la souche de Baarn (438.34) qui excrète encore jusqu'au 15e jour. A partir de ce temps, le taux de protéines dans le milieu baisse pour les trois souches puis augmente à nouveau fortement à partir du 25e jour. La diminution momentanée de la teneur en protéines peut s'expliquer soit par leur hydrolyse, soit par leur réutilisation par les cellules sénescentes. L'augmentation considérable observée au 25e jour est sans doute liée à l'autolyse accélérée des cellules en fin de culture (fig. 2).

D'ailleurs à ce stade, les souches manifestent des modifications morphologiques qui se traduisent pour la souche de Baarn par des filaments mycéliens fortement agglutinés présentant de nombreuses ramifications riches en lipides. Les souches levuro des B 874 et B 974 s'agglutinent également et même, dans certains cas, prennent un aspect filamenteux.

Il est probable que le milieu devenu défavorable entraîne la formation d'éléments de conservation caractérisés par une paroi épaissie (BATCHO, 1973).

2. - Acides aminés libres

Dans le filtrat de culture des trois souches, on trouve les mêmes acides aminés libres (acide aspartique, glycocolle et alanine); ils sont en quantité trop faible pour pouvoir être dosés par notre technique. Les souches compatibles B 874 et B 974 en contiennent toutefois un peu plus que celle de Baarn (438.34).

Dans les trois filtrats, il n'y a ni acide aminé basique, ni acide aminé cyclique.

3. - Acides aminés protéiques

L'arginine, la lysine, l'histidine et la valine sont en faible quantité dans le filtrat des trois souches (tableau 1); pour ce qui concerne les autres acides aminés et particulièrement la tyrosine et la phénylalanine, la souche B 974 en renferme une quantité supérieure à celle des deux autres.

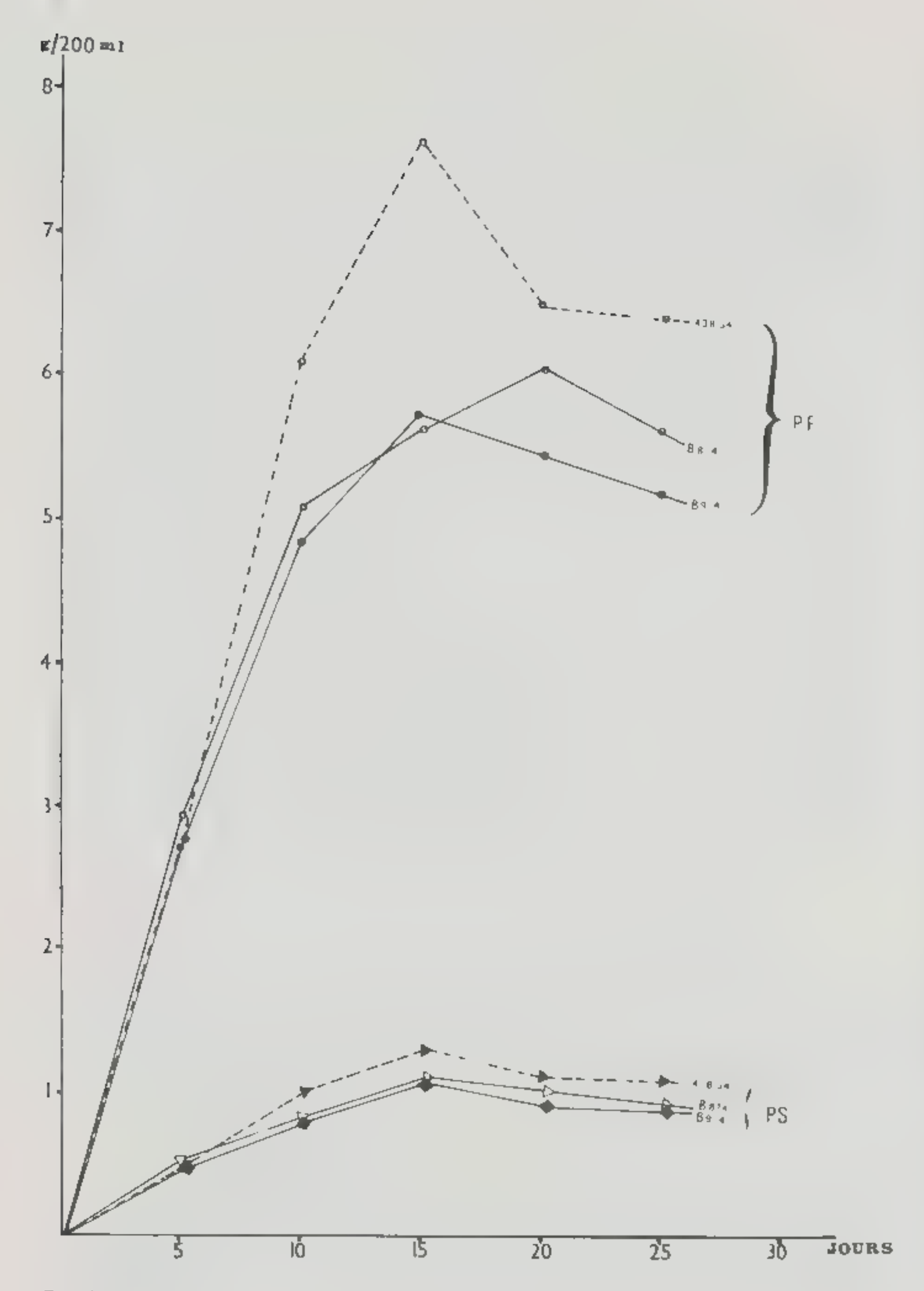


Fig. 1. Croissance en milieu liquide de trois souches d'*Ustilago violacea* : 438 34, B 974 et B 874 PF poids frais. PS: poids sec.

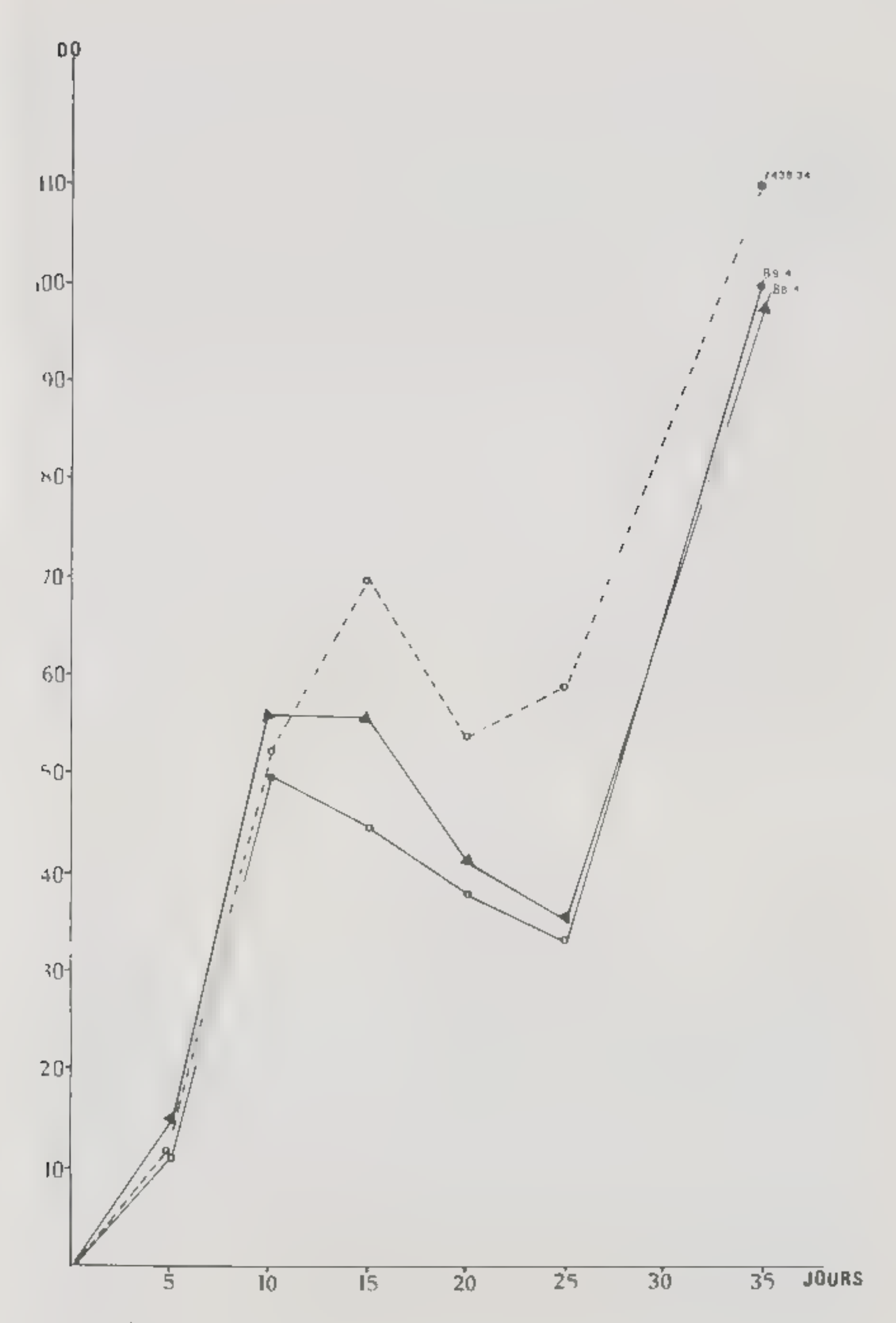


Fig. 2. Évolution des protéines totales excretées au cours de la croissance de trois sou ches d'*Ustilago violacea* lecture de la densité optique (D O), 750nm

Acides aminés		B 874		B 974		438 34	
		Libres	Protéiques	Libres	Protéiques	Libres	Protéiques
Neutres	Glycocolle	++	2,67	++	7,100	+	3,78
	Alanine	++	2,28	++	5,40	+	2,52
	Valine		+		+		+
	Leucine		,20		4,09		2,46
	Isoleucine		0,66		2,35		1,79
	Serine		3,45		0,75		5,02
	Thréonine		2,36		7,48		4,29
Acides	Acide Aspartique	++	4,2	++	10,65	+	6,83
	Acide glutanique		3,67		10,07		5,8[illegible]
Basiques	Lysine		++		++		++
	Arginine		+		+		+
Cycliques	Histidine		++		++		++
	Thyrosine		++		4,06		++
	Phenylalanine		++		4,00		++
	GLcN		3,76		7,78		.

Tableau 1 Teneur en acides aminés libres et protéiques excrétés par l'vinlac dans son milieu de culture

++, signe arbitraire pour évaluation approximative des quantités non dosables par l'autoanalyseur

Les chiffres sont exprimés en nanomoles

Les analogies entre la souche de Baarn 438 34 et B 874 suggèrent qu'elles sont peut être de même signe et de ce fait B 974 et 438 34 devraient être compatibles, parce que de signe contraire. Toutefois, la souche de Baarn, isolée depuis de nombreuses années 1934 a perdu tout pouvoir de conjugaison, ce qui ne permet pas de vérifier cette hypothèse.

En résumé, les trois souches excrètent les mêmes acides aminés protéiques, et parmi ceux-ci les acides aminés acides : acides glutaniques, acide aspartique sont les plus importants (tableau 1).

4. - Détermination des enzymes libérés dans le milieu

Parmi les vingt enzymes identifiables par la méthode de microdosage semi quantitative d'API ZYM, seulement quatre ont été trouvées dans les filtrats d'*Ustilago violacea*. Ce sont la phosphatase alcaline, la phosphatase acide, la phospho amidase et l'estérase lipase (tableau 2). La phosphatase alcaline est plus importante dans le 438 34 que dans les deux autres, alors que la phosphatase acide quantitativement la plus importante des enzymes est excrétée de façon équivalente par les trois souches. L'estérase lipase est la plus faiblement représentée.

Pour les deux souches compatibles B 874 et B 974, le rapport quantitatif des quatre enzymes est identique.

	B 874	B 974	438 34
Phosphatase alcaline	+	+	+++
Phosphatase acide	+++	+++	+++
Phosphoamidase	++	++	++
Esterase lipase	+	+	+

Tableau 2 : Identification et dosage des activités enzymatiques dans le filtrat de culture de l'*Ustilago violacea*
+, ++, +++, signe arbitraire pour l'évaluation de l'activite enzymatique.

CONCLUSION

Les filtrats de culture de l'*Ustilago violacea* sont pauvres en acides aminés libres; l'acide aspartique, le glycocolle et l'alanine ont été mis en évidence dans les trois souches.

Cette carence en acides aminés libres se retrouve dans le filtrat de culture d'*Alternaria solani* (Ell. et Mart.) N. qui n'en renferme qu'un seul, arginine (VIJAYA KUMAR et RAO, 1977) et dans celui d'*Alternaria alternata* (Fr.) K. qui n'en contient aussi qu'un seul à l'état libre (BINOD et coll., 1976). Cependant, la souche virulente de *Rhizoctonia solani* Kühn et R. excrète dans son milieu de culture la sérine, la thréonine, l'histidine, la tyrosine et la valine, alors que la souche non virulente n'excrète que la thréonine et la tyrosine (REDDY et RAO, 1975).

Dans notre cas, la détermination de la nature des produits excrétés par l'*Ustilago violacea* pourrait permettre de préciser leur rôle soit dans la compatibilité des cellules du champignon, soit dans la réduction de la croissance des tissus de Silène leur hôte naturel, soit dans les troubles métaboliques provoqués par sa présence lorsqu'il vit en parasite aux dépens des Caryophyllacées

C'est au cours de la phase active de croissance et en fin de culture que l'excrétion des protéines est la plus importante; les phosphatases (acide et basique), la phosphoamidase et la lipase estérase ont été identifiées dans le filtrat des trois souches. Ces enzymes ont été également trouvées dans le milieu de culture des suspensions cellulaires de *Silene alba*; elles ne sont donc pas responsables de l'inhibition de croissance des tissus isolés de silenes lorsqu'ils sont cultivés en présence du champignon (BATCHO, 1973).

L'identification des acides aminés protéiques montre que les mêmes composés sont excrétés par les trois souches. Seuls les acides aminés acides (acide aspartique, acide glutamique) produits en plus grande quantité pourraient éventuellement jouer un rôle dans l'inhibition de la conjugaison des clônes compatibles, des travaux antérieurs (DUBOIS et coll., 1977) ayant montré que les pH acides sont défavorables à la conjugaison.

Ces produits d'excrétion (acides aminés, protéines et enzymes) sont vraisemblablement des déchets métaboliques éliminés au cours de la croissance des souches d'*Ustilago violacea*. Aucun d'eux ne semble responsable ni de la compatibilité des souches du champignon, ni de la réduction de croissance des colonies tissulaires des silènes. Par contre, leur éventuelle excrétion dans la plante hôte pourrait être à l'origine de troubles métaboliques.

Il faut signaler toutefois que le mycélium dicaryotique d'*Ustilago violacea*, qui vit en parasite dans les Caryophyllacées, pourrait libérer des produits autres que ceux de la forme levuroïde cultivée en milieu artificiel, mais le fait que l'on retrouve les mêmes enzymes, les mêmes acides aminés libres et protéiques dans tous les filtrats de culture constitue un caractère commun qui pourrait être spécifique de l'*Ustilago violacea*.

BIBLIOGRAPHIE

API ZYM, 1977 — réf. 2520 2521. API System. Lab. Balme les grottes. Montalieu-Vercieu, France.

ARJUNAN G., VIDHYASEKARAN P., KANDASWAMY T.K., 1976 — Changes in amino acids and amides content in Jowar Leaves infected by *Helminthosporium turcicum*. *Current. Sci.* 45 : 229-230.

BARBARA J.W. and BOONE D.M., 1963 — *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. XVI. Amino Acids in relation to pathogenicity of two wild type lines to two apple varieties. *Phytopath.* 53 : 979-983.

BATCHO M., 1973 — Étude de quelques effets de l'*Ustilago violacea* (Pers.) Rouss. sur la croissance et la morphogenèse de *Silene alba* (M.) Kr. cultivé in vitro. D.E.A. de biol. vég. Univ. de Lille I.

BATCHO M. et DUBOIS J., 1974 — Étude de quelques effets de l'*Ustilago violacea* (Pers.) Rouss. sur la croissance de colonies tissulaires et de suspensions cellulaires du *Silene alba* (M.) Kr. *Bull. Soc. Bot. Nord de France* 28-29, 51-59.

BINOD BIHARI L., RAM P.R., SHYAMA P.S., MAHENDRA P., 1976 — Variation in amino acids in the growing culture of *Alternaria alternata* (Fr.) K. *Current. Sci.* 45 150-152

CLINTON F.H. and PHILIP W.R., 1977 — Sugar and amino acids contents of *Poa pratensis* infected with *Ustilago striiformis* and *Urocystis agropyri*. Physiol. Plant 41 : 25-28.

DUBOIS J., BATCHO M., BOUSQUET J.F., 1977 — Effets du pH sur la conjugaison in vitro chez *Ustilago violacea* (Pers.) Rouss. *C. R. Acad. Sc. Paris* 284. 619-622.

HANSSLER G., MAXWELL D.P., BARCZEWSKI und BERNHARDT E., 1977 — Cytochemische Lokalisation der sauren Phosphatase in Hyphen von *Pythium paroecandrum* *Botrytis cinerea* und *Rhizoctonia solani*. *Phytopath. Z.* 88 289-298.

HRUSHOVETZ S.B., 1954 — The effect of infection by *Helminthosporium sativum* on the amino acids content of wheat roots. *Canad. J. Bot.* 32: 571-575.

LEGRAND B., BATCHO M., BOUSQUET J.F., DUBOIS J., 1977 — Comparaison des acides aminés libres et des peroxydases d'organes végétatifs et floraux de silènes dioïques *(Silene dioica)* sains ou parasités par l'*Ustilago violacea*. *Phytopath. Z* 90: 273-280.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDAL R.J., 1951 — Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. chem.* 193 : 265-275.

REDDY M.N. and RAO A.S., 1975 - Amino acids in mycelium and cultures filtrates of *Rhizoctonia solani* *Trans. Br. mycol. Soc.* 64 : 527-528.

SHAW M. and COLOTELO N., 1961 — The physiology of host parasite relations VII. The effect of stem rust on the nitrogen and amino acids in wheat leaves *Canad. J. Bot* 39 1351-1372.

VAN ANDEL D.M., 1966 — Amino acids and plant diseases. *Ann. Rev. Phytopath.* 4 340-368

VIJAYA-KUMAR C.S.K. and RAO A.S., 1976 — Amino acids, organic acids and sugars present in mycelium of *Alternaria triticina* and *A. tenuis*. *Trans. Br. mycol. Soc.* 67 3 : 498-499

VIJAYA KUMAR C.S.K. and RAO A.S., 1977 - Amino acids in the mycelium and culture filtrate of *Alternaria solani* *Trans. Br. mycol. Soc.* 69, 1 : 153-154